



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 142 010** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁶ **C 12 N 1/20//A 61 K 39/07, (C 12 N 1/20, C 12 R 1:07)**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 97115505/13, 15.09.1997
(24) Дата начала действия патента: 15.09.1997
(46) Дата публикации: 27.11.1999
(56) Ссылки: SU 1712409 A, 15.02.92. Храмов М.В., Ажермачева Н.И., Савельева Г.М. Разработка питательной среды для глубинного культивирования антибиотикорезистентного вакцинного сибиреязвенного штамма. В: Актуальные вопросы профилактики опасных инфекционных заболеваний. Тез. Докл. Межведомств. научн. конф. 26 - 28 марта 1991, Киров, 1991, с. 95-96.
(98) Адрес для переписки:
610024, Киров, Октябрьский пр-т, 119, НИИМ МО РФ

(71) Заявитель:
Научно-исследовательский институт
микробиологии Министерства обороны
Российской Федерации
(72) Изобретатель: Юдников В.А.,
Шевцов А.Н., Кожухов В.В.
(73) Патентообладатель:
Научно-исследовательский институт
микробиологии Министерства обороны
Российской Федерации

(54) СПОСОБ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ СИБИРЕЯЗВЕННОГО ВАКЦИННОГО ШТАММА СТИ-1

(57) Реферат:
Изобретение предназначено для производства сибиреязвенных вакцин. В процессе выращивания в глубинную культуру вводят предварительно обработанный раствор кукурузного экстракта из расчета 30 - 60 мг % по общему азоту. Процесс глубинного культивирования ведут под контролем микроскопии. Время введения кукурузного экстракта определяется стадией

развития растущих клеток. Критерием введения кукурузного экстракта является наличие в окрашенных по Цилю-Нильсену мазках не менее чем у 90% клеток просветлений цитоплазмы в центре и выраженной грануляции по полюсам. Изобретение обеспечивает увеличение выхода биомассы штамма СТИ-1 за счет уменьшения лизиса вегетативных клеток в процессе роста культуры. 3 табл.

RU 2 142 010 C1

RU 2 142 010 C1



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 142 010** ⁽¹³⁾ **C1**

(51) Int. Cl.⁶ **C 12 N 1/20//A 61 K 39/07, (C
12 N 1/20, C 12 R 1:07)**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 97115505/13, 15.09.1997

(24) Effective date for property rights: 15.09.1997

(46) Date of publication: 27.11.1999

(98) Mail address:
610024, Kirov, Oktjabr'skij pr-t, 119, NIIM MO RF

(71) Applicant:
Nauchno-issledovatel'skij institut
mikrobiologii Ministerstva oborony
Rossijskoj Federatsii

(72) Inventor: Judnikov V.A.,
Shevtsov A.N., Kozhukhov V.V.

(73) Proprietor:
Nauchno-issledovatel'skij institut
mikrobiologii Ministerstva oborony
Rossijskoj Federatsii

(54) **METHOD OF SUBMERGED CULTURING ANTHRAX VACCINE STRAIN STI-1**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, microbiology.
SUBSTANCE: method involves addition of the preliminary treated corn extract in the process of submerged culture growing at amount 30-60 mg% by total nitrogen content. Process of submerged culturing is carried out under microscopy control. Time of addition of corn extract is determined by

the stage of development of growing cells - the presence of cytoplasm clearing in 90% of cells stained by method of Zil-Nielsen in smears, not less, and expressed granulation by poles. EFFECT: increased yield of biomass of the strain STI-1, decreased lysis of vegetative cells in the process of the culture growth. 3 tbl, 3 ex

RU 2 142 010 C 1

RU 2 142 010 C 1

Изобретение относится к биотехнологии производства медицинских иммунологических препаратов, в частности, к способам глубинного культивирования сибиреязвенного вакцинного штамма СТИ-1, и может быть использовано в производстве сибиреязвенных вакцин.

Известен способ глубинного выращивания штамма СТИ-1 с использованием питательной среды на основе 8-часового протосубтилинового гидролизата рыбной кормовой муки и солянокислотного гидролизата кукурузной муки с комплексом минеральных солей (Храмов М.В., Ажермачева Н.И., Савельева Г.М. Разработка питательной среды для глубинного культивирования антибиотикорезистентного вакцинного сибиреязвенного штамма // Актуальные вопросы профилактики опасных инфекционных заболеваний (Тезисы докладов к Межведомственной научной конференции 26-28 марта 1991 г.). - Киров., 1991-е. 95-96).

Недостатком данного способа является низкий выход биомассы (1,5...2,0 млрд. спор в 1 мл культуры), а также невысокая устойчивость спор при лиофильном высушивании.

Наиболее близким к заявляемому способу является способ глубинного выращивания штамма СТИ-1 в аппаратах-культиваторах с использованием жидкой питательной среды на основе 1% солянокислотного гидролизата рыбной кормовой муки. Данный способ используется в производстве живой сухой сибиреязвенной вакцины СТИ-1 для людей (Экспериментально-производственный регламент 364-92. Вакцина сибиреязвенная живая сухая для подкожного и скарификационного применения)

При посевной дозе (400±100) тыс. спор в 1 мл среды и культивировании с перемешиванием и аэрацией получают 1,5...1,8 млрд. спор в 1 мл культуры.

К недостаткам вышеуказанного способа следует отнести высокий процент лизиса вегетативных клеток в процессе выращивания (50...80%) и, как следствие этого, сравнительно низкую концентрацию спор в нативной культуре.

Цель изобретения - повышение выхода спор штамма СТИ-1 при глубинном выращивании в аппаратах-культиваторах за счет уменьшения лизиса вегетативных клеток с сохранением высокой устойчивости спор к лиофильному высушиванию при приготовлении живой сухой сибиреязвенной вакцины для людей.

Поставленная цель достигается за счет дополнительного внесения на определенной стадии развития культуры специально обработанного стерильного раствора кукурузного экстракта.

Сущность предложенного способа заключается в следующем. В процессе глубинного выращивания в культуру добавляют специально обработанный раствор кукурузного экстракта из расчета 30...60 мг % по общему азоту. Для приготовления раствора кукурузного экстракта используют коммерческий жидкий кукурузный экстракт (ГОСТ 18-206-74 или ТУ 10-04-08-14-88), который разводят дистиллированной водой в соотношении 1:3, нагревают при перемешивании до

температуры (62±5)°С, подщелачивают 20% раствором гидроксиды натрия до величины pH 7,1±0,2, после чего нагревают до (85±5)°С и фильтруют с использованием нутч-фильтра через картон марки "Т".

Обработанный и фильтрованный раствор кукурузного экстракта по своим физико-химическим свойствам должен удовлетворять следующим требованиям:

внешний вид - жидкость коричневого цвета;

общий азот, мг % - 700±100;

аминный азот, мг % - 400±50;

pH, ед. pH - 7,1±0,2.

Приготовленный раствор обработанного и фильтрованного кукурузного экстракта разливают в 20 л бутыли, оборудованные специальным монтажом, и стерилизуют в автоклаве при температуре 120...125°С в течение 30...35 мин. Стерильный раствор кукурузного экстракта хранят при температуре 2...6°С не более 1 мес.

Время введения обработанного кукурузного экстракта в глубинную культуру определяется стадией развития растущих клеток, т.е. процесс глубинного культивирования ведут под контролем микроскопии. Критерием, по которому осуществляют введение раствора кукурузного экстракта, является наличие в мазках, окрашенных по Цилю-Нильсену, не менее чем у 90% клеток просветлений цитоплазмы в центре и выраженной грануляции по полюсам.

Увеличение выхода биомассы штамма СТИ-1 при глубинном выращивании с добавкой раствора кукурузного экстракта в динамике роста обусловлено уменьшением лизиса вегетативных клеток, который связан с наступающим в процессе роста культуры дефицитом питательных веществ.

Изобретение позволяет увеличить выход спор штамма СТИ-1 достоверно на 50...70% в сравнении с аналогом, причем предлагаемый способ не требует дефицитных субстратов.

Культивирование штамма СТИ-1 проводили:

а/ в колбах вместимостью 0,25 л, коэффициент заполнения (К) = 0,1, при 32...33°С, доза посевного материала - (400±100) тыс. спор в 1 мл, число качаний - 150...180 мин⁻¹;

б/ в аппаратах-культиваторах вместимостью 160 л, К = 0,5, уровень аэрации 0,2...0,4 об/об.мин, число оборотов мешалки - 320 мин⁻¹, доза посевного материала - (400 ±100) тыс. спор в 1 мл.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Из представленных в табл. 1 экспериментальных данных следует, что оптимальным временем добавки раствора кукурузного экстракта является отрезок между 11 и 11,5 ч выращивания, когда количество клеток с просветлениями в цитоплазме достигало 85% и более от общего числа клеток. Увеличение выхода спор в нативной культуре при этом составило 60% (2,7 млрд спор против 1,7 млрд спор в 1 мл в опыте без добавки кукурузного экстракта).

Пример 2. Из представленных в табл. 2 данных следует, что оптимальной является добавка кукурузного экстракта из расчета

30...60 мг % по общему азоту. Добавка экстракта в вышеуказанных пределах снижает количество лизированных клеток с 43% (без добавки) до 8...14% и повышает выход спор с 1,6 (без добавки) до 2,6...2,8 млрд спор в 1 мл культуры.

Пример 3. По результатам, представленным в табл. 3, видно, что предлагаемый способ глубинного выращивания штамма СТИ-1 с добавкой раствора кукурузного экстракта в процессе роста позволяет увеличить выход спор на 50... 70%. При этом показатели качества глубинных культур - содержание жизнеспособных и нормально окрашенных спор, а также устойчивость их к прогреву имеют адекватные значения.

Формула изобретения:

Способ глубинного культивирования сибиреязвенного вакцинного штамма СТИ-1 в питательной среде из 1%-ного солянокислотного гидролизата рыбкоостной муки и кукурузного экстракта с добавками солей и глюкозы, отличающийся тем, что культивирование проводят под контролем микроскопии и при наличии в мазках просветлений цитоплазмы в центре и выраженной грануляции по полюсам, наблюдаемых не менее чем у 85% от общего числа клеток, вводят раствор кукурузного экстракта с общим и аминным азотом 600 - 800 и 350 - 450 мг % соответственно, из расчета 30 - 60 мг % по общему азоту.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

Влияние времени введения кукурузного экстракта на выход спор штамма

СТИ-1 при выращивании в колбах на шуттель-аппарате

Возраст культуры на момент ввода до-бавки, ч	Количество клеток с просветлениями в цитоплазме, %	Характеристика споровой культуры	
		Концентрация спор по счету, млрд см ⁻³	Содержание нормально окрашенных по Цилю-Нильсену спор, %
.	не определяли	1,7	96
0	0	1,7	96
5	0	1,7	95
9	5	1,7	94
10	60	1,9	96
11	85	2,6	95
11,5	более 90	2,7	94
12	более 90	2,5	95
12,5	более 90	2,0	92

Примечание. *- дополнительного введения кукурузного экстракта не производили.

Влияние дозы кукурузного экстракта на выход спор штамма СТИ-1 при выращивании в колбах на шуттель-аппарате

Доза кукурузного экстракта по об- щему азоту, мг%.	Характеристика споровой культуры		
	Концентрация спор по счету, млрд. см ⁻³	Содержание нор- мально окрашен- ных по Цию- Нильсену спор, %	Количество лизированных клеток, %
не вводился	1,6	95	43
20	1,7	96	34
30	2,6	95	14
45	2,8	94	8
60	2,7	95	10
70	2,5	92	15
80	2,3	92	18

RU 2142010 C1

RU 2142010 C1

Характеристика глубинных культур штамма СТИ-1, полученных в
аппаратах-культиваторах (по данным 5 опытов)

Показатели нативной споровой культуры	Культура , полученная по ...	
	способу-прототипу	заявляемому способу
Концентрация спор по сче- ту, млрд см ⁻³	1,7±0,2	3,0± 0,3
Содержание жизнеспособ- ных спор ,%	95± 3	93± 3
Содержание нормально ок- рашенных по Цилло- Нильсену спор, %	95± 3	94± 4
Термоустойчивость ,% *	62± 12	60± 10

Примечание. *- прогрев спор осуществляли при 83° С в течение 10 мин.

RU 2142010 C1

RU 2142010 C1

THIS PAGE LEFT BLANK